COMPARACION DE TRES DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACION DE LOS ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DEL EPIDIDIMO EN EL CIERVO

Ortiz N., García A., Montoro V.*, Gallego L., Garde J.J.
Dpto. Ciencia y Tecnología Agroforestal. ETSIA Albacete. U.C.L.M.
*CERSYRA de Valdepeñas. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de Castilla-La Mancha.

1. INTRODUCCION.

Actualmente en España, uno de los problemas que presentan las fincas cinegéticas dedicadas a la cría del venado es la presencia de elevadas tasas de consanguinidad entre sus efectivos, hecho que provoca una disminución de la calidad de los trofeos. Introducir animales nuevos, para evitar esta problemática representa riesgos de tipo sanitario, económicos y de manejo. Estos inconvenientes pueden eliminarse con el empleo de la Inseminación Artificial (IA) con semen descongelado, la cual permite el establecimiento de esquemas de mejora genética, la difusión del semen de los animales selectos y además resulta una estrategia importante cuando se consideran genotipos en peligro de extinción. Uno de los aspectos más problemáticos que presenta la IA cuando se realiza en animales salvajes, es el desarrollo de técnicas de obtención seminal sencillas. Así, en nuestra situación la única técnica que permite la recogida del material seminal en el animal vivo es la de la electroeyaculación, la cual presenta riesgos de diversa naturaleza (Asher *et al.*, 1993). Por tanto, en nuestro contexto el sistema más factible para la obtención de muestras espermáticas en el ciervo, por lo menos *a priori*, es la recogida *postmortem* del material espermático.

Por todo ello, el objetivo de nuestro proyecto consiste en el desarrollo de una sistemática de congelación que permita mejorar la calidad del semen descongelado procedente de venados abatidos durante el desarrollo de las actividades cinegéticas y que posibilite el mantenimiento en el tiempo del poder fecundante de estos espermatozoides. En una primera etapa, pretendemos comparar el efecto crioprotector de dos diluyoconservadores habitualmente empleados para la congelación del semen de ciervo, con el aportado por un tercer diluyente formulado específicamente en nuestro laboratorio para el semen de ciervo.

2. MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo se realizó a partir de muestras espermáticas obtenidas *postmortem* de los epidídimos de 15 venados adultos abatidos por cacería selectiva durante al época de "berrea" de 1995. Una vez realizada la contrastación inicial se procedió a la mezla de las muestras espermáticas procedentes de tres machos distintos, dividiéndose el volumen final en tres alícuotas con el fin de desarrollar con ellas tres técnicas de congelación (A, B, C) que difieren esencialmente en la composición de los agentes crioprotectores. Como diluyentes para la conservación del semen se utilizaron los tres siguientes:

(A) CIT: Citrato sódico y fructosa (Krzywinski, 1981).

(B) TRI: Triladyl ® (Haigh *et al.*, 1993).

(C) LAC: Tris, ácido cítrico, fructosa, glicina y lactosa (Diluyente experimental).

Los tres diluyentes incorporan en su constitución diferentes concentraciones de glicerol y yema de huevo. El procesado de las muestras para su congelación fue similar para los 3 medios empleados, diluyéndose inicialmente las muestras a temperatura ambiente con una primera fracción de cada menstruo, las cuales no contienen glicerol ni lactosa (diluyente C).

Posteriormente, el material seminal fue refrigerado a 5°C en 90 min, realizándose una segunda dilución a dicha temperatura con la segunda fracción de cada solución crioprotectora (las cuales incorporan glicerol - diluyente A- y glicerol y lactosa - diluyente C). Las muestras permanecieron a 5°C durante 2 horas para su equilibración. Para el triladyl la dilución se realizó en un único paso, añadiéndose el volumen total de diluyente a temperatura ambiente. Ulteriormente, se envasaron las dosis en pajuelas de 0,25 ml, congelándose sobre vapores de nitrógeno líquido. La descongelación se realizó en un baño térmico a 37°C durante 1 minuto.

La contrastación seminal inicial, a la precongelación, después de la congelación y luego de la prueba de termorresistencia (2 horas a 37°C), se realizó mediante la determinación de la motilidad individual (MI), el porcentaje de acrosomas intactos (PIA) y la tasa de endósmosis positiva en medio hipotónico (E+). Se realizaron cinco replicados independientes, evaluándose cinco dosis para cada diluyente por replicado.

Los datos obtenidos fueron comparados mediante el empleo de un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SAS. Las diferencias significativas entre grupos fueron detectadas por el test de significación mínima de Fisher.

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

La evaluación postdescongelación de las dosis seminales reflejó diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) entre los distintos medios crioprotectores. Así, las dosis congeladas con LAC mostraron los mayores valores de MI, PIA y E+, seguidas de las diluidas en TRI (Tabla 1).

De igual modo, el diluyente LAC presentó los mayores índices de resistencia a la congelación para MI y PIA (78,2% y 69,5%, respectivamente), así como de resistencia térmica, siendo estas diferencias con respecto a los otros 2 diluyentes, altamente significativas ($p<0,001$), (Tablas 2 y 3).

En base a nuestros resultados podemos observar que el diluyente habitualmente utilizado hasta ahora para la congelación del semen de ciervo, Citrato sódico-yema de huevo-glicerol (Krzywinski A., 1981), tiene poca capacidad crioprotectora presentando valores inferiores de MI, PIA y E+ en todos los momentos estudiados con respecto a los otros dos diluyentes.

En la búsqueda de un sistema óptimo de congelación que permita incrementar la calidad seminal de las dosis descongeladas de muestras obtenidas *postmortem*, encontramos los mejores resultados para el diluyente experimental a base de lactosa. En efecto, tanto los parámetros indicadores de integridad de las distintas membranas celulares (PIA y E+), como los de motilidad espermática, resultaron significativamente mayores para este diluyente, tanto en la descongelación como después de la prueba de termorresistencia.

Analizando los tres criodiluyentes en conjunto, encontramos que las diferencias entre ellos puede deberse a la presencia de lactosa en el diluyente experimental, la cual no se encuentra presente en los otros dos crioprotectores estudiados. Este azúcar le confiere un carácter hipertónico al medio y actúa como agente deshidratante de las células espermáticas, al no ser permeable para la membrana plasmática. La disminución del agua intracelular debida a la hipertonicidad de este medio, contribuiría a una mayor criopreservación debido a la menor formación de cristales de hielo dentro de la célula.

Podemos concluir en el presente trabajo, que el diluyente experimental a base de lactosa como azúcar osmóticamente activo, presenta una alta capacidad de preservación de la calidad espermática e integridad de la membrana celular, resultando ideal a la hora de congelar muestras de semen de ciervo obtenidas *postmortem*.

4. BIBLIOGRAFIA

Asher, G.W., Fisher, M.W., Fennessy, P.F., Mackintosh, C.G., Jabbour, H.N. y Morrow C.J., 1993. Animal Reproduction Science, 33: 241-265.
Haigh J.C., Dradjat, A.S. y English, A.W., 1993. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 24(4): 454-458.
Krzywinski, A., 1981. Acta Theriologica, 25: 424-426.

TABLA 1. Efecto de tres medios crioprotectores sobre la calidad espermática postdescongelación en el ciervo.

	Diluyente		
Parámetro	**CIT**	**LAC**	**TRI**
MI (%)	$35,00 \pm 0,96^{c}$	$58,60 \pm 0,94^{a}$	$49,20 \pm 0,85^{b}$
PIA (%)	$37,28 \pm 0,99^{c}$	$58,00 \pm 0,89^{a}$	$45,36 \pm 0,83^{b}$
E+ (%)	$37,48 \pm 0,72^{c}$	$52,72 \pm 1,14^{a}$	$44,08 \pm 0,85^{b}$

TABLA 2. Efecto de tres medios crioprotectores sobre la criorresistencia (CR) de los espermatozoides de ciervo.

	Diluyente		
Parámetro	**CIT**	**LAC**	**TRI**
MI (%)	$47,34 \pm 1,29^{c}$	$78,29 \pm 1,30^{a}$	$60,77 \pm 1,06^{b}$
PIA (%)	$47,28 \pm 1,35^{c}$	$69,55 \pm 0,98^{a}$	$55,58 \pm 1,14^{b}$

TABLA 3. Efecto de tres medios crioprotectores sobre la Resistencia Térmica (RT) de los espermatozoides descongelados en el ciervo.

	Diluyente		
Parámetro	**CIT**	**LAC**	**TRI**
MI (%)	$50,27 \pm 2,34^{c}$	$81,94 \pm 0,84^{a}$	$57,50 \pm 1,49^{b}$
PIA (%)	$68,88 \pm 2,12^{c}$	$86,59 \pm 0,90^{a}$	$78,25 \pm 0,84^{b}$
E+ (%)	$80,27 \pm 1,21^{b}$	$86,37 \pm 1,28^{a}$	$83,03 \pm 1,16^{ab}$

Todos los valores representan las medias ± sem para n=25

^{a,b,c} Grupos en la misma fila con distintos superíndices son estadisticamente diferentes ($p < 0.05$)

CR= (valor postdescongelación/valor precongelación)× 100

R.T.= (valor postdescongelación 2 hrs/valor postdescongelación 0 hrs)× 100